

RAPPORT D'ETUDE

Study Report

Version finale du 26 Août 2003

Final version: August 26, 2003

EVALUATION DU POUVOIR PHOTOTOXIQUE SUR EPIDERMES HUMAINS RECONSTRUISTS IN VITRO.

*IN VITRO ASSESSMENT OF PHOTOTOXIC POTENTIAL
USING HUMAN RECONSTRUCTED EPIDERMIS.*

RAPPORT : PTC_E 03.581 / 582
(REPORT)

PRODUITS ETUDES : VITAMINE K1 PHYTONADIONE
(TEST PRODUCTS) VITAMINE K OXYDE

DEMANDEUR DE L'ETUDE : AURIGA INTERNATIONAL SA
(SPONSOR OF THE STUDY) CHEMIN DES ROUSSETTES, 2
B-1410 WATERLOO
BELGIUM

EXPERIMENTATEUR : BIO-HC
(RESEARCH LABORATORY) PARC D'ACTIVITÉS DE CANTERANNE
AVENUE DE CANTERANNE
33600 PESSAC

SOMMAIRE - CONTENTS

<u>1. INTRODUCTION - INTRODUCTION</u>	3
<u>2. MATERIEL ET METHODES - MATERIAL AND METHODS</u>	3
2.1 PRODUITS ETUDES - <i>TEST PRODUCTS</i>	3
2.2 DEROULEMENT DE L'ETUDE - <i>STUDY DEVELOPMENT</i>	3
2.2.1 EPIDERMES HUMAINS RECONSTITUES - <i>HUMAN RECONSTITUTED EPIDERMIS</i>	4
2.2.2 PHOTOTOXICITE SUR EPIDERMES HUMAINS - <i>PHOTOTOXICITY ASSAY ON HUMAN EPIDERMIS</i>	4
<u>3. RESULTATS - RESULTS</u>	4
3.1 TOXICITE SUR EPIDERMES HUMAINS - <i>TOXICITY ON HUMAN SKIN MODEL</i>	4
3.2 PHOTOTOXICITE SUR EPIDERMES HUMAINS - <i>PHOTOTOXICITY ON HUMAN SKIN MODEL</i>	5
<u>4. ARCHIVAGE - ARCHIVES</u>	8
<u>5. RESUME & CONCLUSION - SUMMARY & CONCLUSION</u>	9

ANNEXE (APPENDIX): DONNEES BRUTES TABLEAUX - *DATA TABLES*

PAGES 1 à 4

1. INTRODUCTION - INTRODUCTION

L'objet de cette étude était d'évaluer le potentiel phototoxique de deux actifs. Compte tenu du caractère non hydrosoluble des produits à l'étude, une approche expérimentale basée sur l'utilisation d'épidermes humains reconstruits *in vitro* a été proposée.

*The purpose of this study was to assess the phototoxic potential of two active ingredients. As the tested products were non-hydrosoluble compounds, an *in vitro* experimental approach based on the use of reconstituted human epidermis was proposed.*

2. MATERIEL ET METHODES - MATERIAL and METHODS

2.1 PRODUITS ETUDES - TEST PRODUCTS

Afin de réaliser cette étude, la Société AURIGA INTERNATIONAL SA, CHEMIN DES ROUSSETTES, 2, B-1410 WATERLOO, nous a adressé, le 18 Juillet 2003, un échantillon des produits « VITAMINE K1 PHYTONADIONE », et « VITAMINE K OXYDE » dont les caractéristiques étaient les suivantes :

• VITAMINE K1 PHYTONADIONE

- Récipient : flacon verre
- Forme : huile
- Couleur : jaune
- Quantité : 10 ml
- pH : -

Il a été identifié sous le code BIO-HC : 03.581

• VITAMINE K OXYDE

- Récipient : flacon verre
- Forme : huile
- Couleur : jaune
- Quantité : 10 ml
- pH : -

Il a été identifié sous le code BIO-HC : 03.582

Les résultats exposés ci-après ne concernent que les échantillons fournis par le commanditaire, ce dernier demeure responsable de l'identité entre ces échantillons et les produits mis sur le marché.

2.2 DEROULEMENT DE L'ETUDE - STUDY DEVELOPMENT

L'étude a été réalisée, entre le 22/07/2003 et le 25/07/2003 selon le protocole expérimental décrit ci-après.

To perform this study, a sample of the test compounds "VITAMINE K1 PHYTONADIONE" and "VITAMINE K OXYDE", sent by the Company AURIGA INTERNATIONAL SA, CHEMIN DES ROUSSETTES 2, B-1410 WATERLOO, was received on July 18, 2003.

Their characteristics were as follows :

• VITAMINE K1 PHYTONADIONE

- Container : glass flask
- Aspect : oil
- Color : yellow
- Quantity : 10 ml
- pH : -

It was identified under the number : 03.581

• VITAMINE K OXYDE

- Container : glass flask
- Aspect : oil
- Color : yellow
- Quantity : 10 ml
- pH : -

It was identified under the number : 03.582

The results presented concern only the samples supplied by the sponsor of the study, the concordance between the test samples and the final commercial products remains on his own responsibility.

The study was performed between the 07/22/2003 and the 07/25/2003, according to the experimental protocol described below.

2.2.1 EPIDERMES HUMAINS RECONSTITUÉS - HUMAN RECONSTITUTED EPIDERMIS

L'étude a été réalisée sur des épidermes humains reconstitués SKINETHIC™ obtenus à partir de kératinocytes humains cultivés en condition émergée pendant 17 jours dans un milieu chimiquement défini, sur des filtres microporeux en polycarbonate de 0.63 cm². Les principales caractéristiques de ces épidermes reconstruits *in vitro* ont été précédemment décrites.

Study was performed on Human Reconstituted Epidermis supplied by SKINETHIC™ laboratory. The main characteristics of this model have already been described elsewhere. In brief, a fully differentiated epithelium having the features of the human epidermis was obtained by culturing human keratinocytes in a chemically-defined medium, on inert microporous polycarbonate filters at the air-liquid interface.*

2.2.2 PHOTOTOXICITE SUR EPIDERMES HUMAINS - PHOTOTOXICITY ASSAY ON HUMAN EPIDERMIS

Dès réception, les épidermes SKINETHIC™ sont transférés dans des plaques de 6 puits contenant du milieu de maintenance (1 ml) et placés à l'incubateur à 37°C, 5% CO₂ saturé d'humidité, pendant 24 heures.

Après incubation, le milieu de maintenance est éliminé et remplacé par du milieu neuf. Le produit à l'étude est directement appliqué, à raison de 10 mg/cm², à la surface des épidermes. Les épidermes « traités » sont ensuite replacés à l'incubateur pendant 6 ou 24 heures.

Après incubation, les inserts contenant les épidermes sont vidés. Les épidermes sont ensuite soumis à une exposition UV_A à l'aide de tubes Philips TL20W/09N (énergie 3.2 mW/cm²). Immédiatement après irradiation, les épidermes sont transférés dans de nouvelles plaques de 6 puits contenant du milieu de maintenance neuf. Les plaques sont mises à incuber à 37°C, pendant 24h, en étuve air-CO₂.

À la fin de la période d'incubation, un test de viabilité au MTT est réalisé. Les épidermes sont rincés au HBSS puis transférés dans une plaque 6 puits contenant une solution de MTT (2 ml/puits). 400 µl de MTT sont introduits dans chaque insert. Après 2h d'incubation, les biopsies sont prélevées et transférées dans une plaque 24 puits contenant du DMSO (1 ml/puits). Après 2h d'incubation, des aliquots (*n*=3) de la solution d'extraction (200 µl) sont prélevés. Les densités optiques des solutions sont mesurées à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Dynatech MR 5000).

In accordance with the manufacturer's recommendations, REPs were transferred to 6-well culture dishes containing 1 ml/well of maintenance medium supplied with the kit and incubated overnight at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

After incubation, the maintenance medium was replaced by fresh medium Test compound (10 mg/cm²) was directly applied onto the surface of the epidermis, using an automatic pipette. The REPs were incubated, at 37°C with a 5%CO₂/95% air atmosphere, for 6 or 24 hr.

After incubation, the REPs were exposed to UV_A-light with 3.2 mW/cm² (TL20W/09N Philips lamp) for various exposure times. The resulting irradiation doses were 6J/cm² and 18 J/cm².

After the irradiation, the REPs were placed in new six-well culture plates containing fresh medium and incubated for 24 hr under a 5%CO₂/95% air atmosphere..

After incubation, the REPs were rinsed with HBSS and tested for viability by a MTT test.

The REP samples were transferred in a 6-well culture dish containing 2 ml of the MTT solution. 400 µl of the MTT solution were added into each insert.

*After 2 hr incubation at 37°C, the formazan crystals were extracted by incubating for 2h biopsies into 24-well culture dish containing DMSO (1 ml/well). After extraction, 200 µl of extracts (*x*3) were transferred to a 96-well microplate and optical density (O.D.) was measured at 570 nm using a microplate reader (Dynatech MR 5000).*

3. RESULTATS - RESULTS**3.1 TOXICITE SUR EPIDERMES HUMAINS - TOXICITY ON HUMAN SKIN MODEL**

Cet essai a été réalisé sur des épidermes SKINETHIC (Lot N° 03 022A 0702) de surface 0.63 cm².

Les produits [03.581] et [03.582] ont été appliqués tel quel (100%) et dilués à 10 et 1% (v/v) dans l'huile de paraffine.

Après une période d'acclimatation à 37°C des tissus, 10µl de chaque solution-test ont été déposés directement sur le stratum corneum des épidermes (*n*=2). Les tissus ont été ensuite replacés à l'incubateur à 37°C, pendant 18 heures.

La viabilité des tissus a été évaluée, en fin d'essai, par un test MTT.

This toxicity assay was carried out using SKINETHIC cultures (0.63 cm² epidermis, Lot n° 03 022A 0702).

The test products [03.581] and [03.582] were tested as supplied (i.e., 100%) and diluted to 10 and 1% (v/v) in paraffin oil. Following an initial acclimatisation at 37°C/5% CO₂ in air, epidermis were treated overnight (approximately 18h) in duplicate with 10µl of each test substance directly applied to the culture surface, on the dry stratum corneum of epidermis.

The toxic effect of the tested substances was assessed by using the MTT assay.

* Rosdy M., et al. British J. Dermatol., 129, 227-234, 1993.

Les données brutes sont consignées dans les tableaux 1 et 2 (annexe).

• VITAMINE K1 PHYTONADIONE

Le tableau suivant regroupe l'ensemble des résultats.

Raw data are collected in tables 1 and 2 (appendix).

• VITAMINE K1 PHYTONADIONE

Results are exposed in the following table.

	TEMOIN (CONTROL)	PRODUIT 03.581 (TEST PRODUCT)		
		0	1% (v/v)	10% (v/v)
D.O (moyenne) St. Dev.		1.026 0.002	0.987 0.006	0.950 0.006 0.015
Viabilité (Viability)	100%		96%	93% 93%

Aucune diminution significative de la viabilité des tissus n'est observée après traitement avec les différentes solutions-tests. Ces résultats traduisent la très faible toxicité du produit [03.581] vis-à-vis des épidermes reconstruits.

The REPs did not respond to the product application by a dose-dependent decrease in tissue viability. No significant cytotoxicity was observed in epidermis exposed to the different test solutions, indicating a very low toxicity of the test product [03.581] on human epidermis.

• VITAMINE K OXYDE

Les résultats sont identiques à ceux enregistrés avec le produit [03.581]. Aucun effet toxique significatif n'est enregistré dans la gamme des concentrations testées.

• VITAMINE K OXYDE

Results are similar to those recorded with the test product [03.581]. No significant toxicity was observed, in the range of tested concentrations with the product [03.582].

	TEMOIN (CONTROL)	PRODUIT 03.582 (TEST PRODUCT)		
		0	1% (v/v)	10% (v/v)
D.O (moyenne) St. Dev.		1.026 0.002	0.924 0.007	0.929 0.008 1.026 0.009
Viabilité (Viability)	100%		90%	91% 100%

Compte tenu de ces résultats, il a été décidé d'appliquer les 2 produits à l'étude non dilués, pendant 24h, avant de procéder à l'exposition UV.

Taking into account these results, the 2 test substances would be applied undiluted (100%) on the culture surface, for a 24h incubation period prior to UV exposure.

3.2 PHOTOTOXICITE SUR EPIDERMES HUMAINS – PHOTOTOXICITY ON HUMAN SKIN MODEL

L'essai a été réalisé sur des épidermes SKINETHIC (0.63 cm², Lot N° 03 022A 0702) répartis en deux lots :

- Lot Témoin : 6 épidermes non traités.
- Lot Traités : 6 épidermes traités avec les produits purs

CONDITIONS EXPERIMENTALES

1. Traitement des épidermes : application des produits à la surface des tissus. Volume appliqué : 6.3 µl
2. Incubation des épidermes pendant 24 heures.
3. Lavage des épidermes à l'aide d'une solution de HBSS.
4. Irradiation des tissus : UV_A = 6 J/cm² (3 épidermes/dose UV_A). Parallèlement, 3 épidermes de chaque lot sont conservés à l'obscurité, à température ambiante, pendant l'irradiation.
5. Incubation des épidermes à 37°C pendant 24h.
6. Mesure de la viabilité tissulaire par test MTT.

This assay was performed on SKINETHIC reconstituted epidermis (0.63 cm², Lot n° 03 022A 0702) divided into 2 groups :

- "Control" group : 6 untreated epidermis.
- "Treated" group : 6 epidermis treated with product as supplied.

EXPERIMENTAL CONDITIONS

1. Treatment of epidermis : Test product (6.3 µl/epidermis) was applied directly onto the surface of tissues.
2. Incubation of control and treated REPs at 37°C for 24 hr.
3. Washing of REPs with HBSS.
4. Irradiation of epidermis to UV_A dose : 6 J/cm² (3 biopsies/UV_A dose). Concurrently, 2 epidermis of each experimental group were kept at room temperature in the dark during UV_A exposure (dark control).
5. Incubation of REPs at 37°C, for 24h.
6. Viability was assessed by a MTT test.

Les données brutes sont consignées dans les tableaux 3 et 4 (annexe).

Raw data are collected in tables 3 and 4 (appendix).

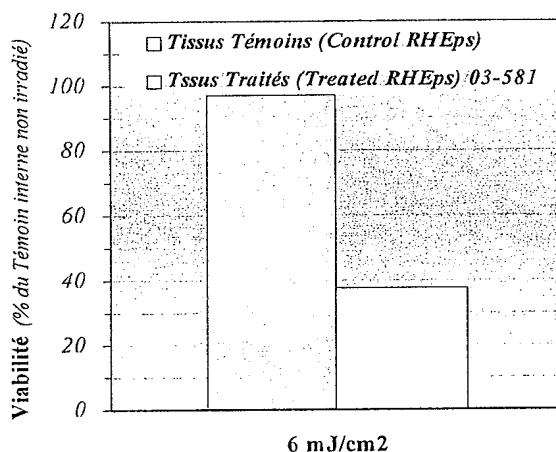
• VITAMINE K1 PHYTONADIONE

Le tableau suivant regroupe l'ensemble des résultats.

• VITAMINE K1 PHYTONADIONE

Results are exposed in the following table.

	TEMOIN (CONTROL)		TRAITE (TREATED) 03.581	
	0	6 J/cm ²	0	6 J/cm ²
D.O (moyenne) St. Dev.	0.899 0.005	0.871 0.008	0.861 0.011	0.323 0.011
Viabilité (Viability)	100%	97%	100%	38%
Cytotoxicité (Cytotoxicity)		3%		62%



Au niveau des épidermes témoins :

La dose 6 J/cm² induit une très faible diminution de la viabilité (97% de viabilité). Ce résultat, conforme à celui attendu, permet de considérer cette dose UV_A comme non toxique.

Au niveau des épidermes traités avec 03.581 :

En absence d'irradiation UV_A, la viabilité des épidermes traités est égale à 96% (en % du contrôle « Epidermes Non Traités ») confirmant la très faible toxicité du produit [03.581] vis-à-vis des épidermes humains.

La réponse aux UV_A des épidermes du groupe « Traité » est très différente de celle des épidermes du groupe « Témoin ». Les radiations UV_A (6 J/cm²) induisent une réduction de 62% de la viabilité tissulaire au niveau des épidermes traités. Dans les mêmes conditions d'exposition, la viabilité des épidermes témoins est réduite de 3%.

Ces résultats montrent que le produit [03.581] potentialise très nettement la toxicité des UV_A : la viabilité des épidermes traités est, comparativement aux épidermes témoins, diminuée de plus de 30% après irradiation UV_A : une diminution de 63% a été enregistrée après exposition à 6 J/cm².

In untreated epidermis:

A very slight cytotoxicity was observed in epidermis exposed to UV_A at 6 J/cm² (97% viability). This UV_A dose could be considered as non cytotoxic.

In treated epidermis:

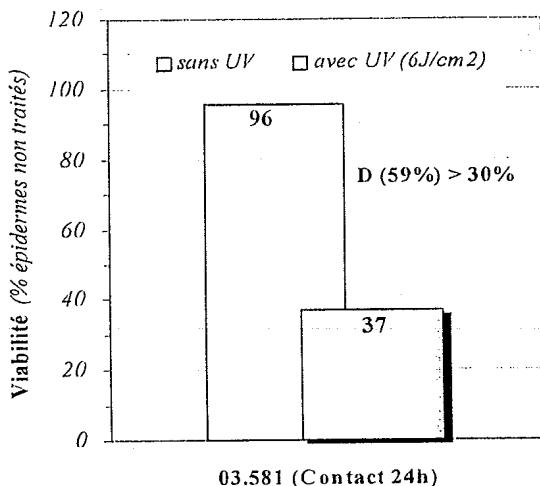
In the absence of UV_A irradiation, the tested product induced a very slight decrease in MTT response of tissues. Comparatively to the untreated tissues, MTT response was decreased by 4%, indicating a very low toxicity of the product [03.581] on human epidermis.

A quite different response to UV_A radiation was observed in treated epidermis. Viability of treated epidermis was reduced by 62% after exposure to 6 J/cm² dose whereas, in the same experimental conditions, the viability of control tissues was reduced by only 3%.

These results indicate that the test compound [03.581] induced a significant increase of UV_A-induced toxicity. In the absence of UV_A, the tested product reduced by 4% tissue viability, as compared to the untreated tissues. After UV_A exposure using 6 J/cm², tissue viability as compared to untreated but irradiated control tissues was reduced by 63%. So, the decrease in the viability of tissues treated with the test product [03.581] followed by UV_A irradiation exceeded the 30% rule for phototoxicity prediction indicating no phototoxicity.

La figure suivante illustre les résultats obtenus (viabilité exprimée en % du contrôle « Epidermes Non traités »).

Data (viability expressed in % of "untreated Epidermis" control) are illustrated by the following figure.



• VITAMINE K OXYDE

Le tableau suivant regroupe l'ensemble des résultats.

• VITAMINE K OXYDE

Results are exposed in the following table.

	TEMOIN (CONTROL)		TRAITE (TREATED) 03.582	
	0	6 J/cm ²	0	6 J/cm ²
D.O (moyenne) St. Dev.	0.899 0.005	0.871 0.008	0.842 0.010	0.831 0.010
Viabilité (Viability)	100%	97%	100%	99%
Cytotoxicité (Cytotoxicity)		3%		1%

Au niveau des épidermes témoins :

La dose 6 J/cm² induit une très faible diminution de la viabilité (97% de viabilité). Ce résultat, conforme à celui attendu, permet de considérer cette dose UV_A comme non toxique.

Au niveau des épidermes traités avec 03.582 :

En absence d'irradiation UV_A, la viabilité des épidermes traités est égale à 94% (en % du contrôle « Epidermes Non Traités ») confirmant la très faible toxicité du produit [03.582] vis-à-vis des épidermes humains.

La réponse aux UV_A des épidermes du groupe « Traité » est similaire à celle des épidermes du groupe « Témoin ». En effet, les radiations UV_A à 6 J/cm² induisent une réduction de 1% de la viabilité des épidermes traités. Dans les mêmes conditions d'exposition, la viabilité des épidermes témoins est réduite de 3%.

Ces résultats montrent que le produit [03.582] ne potentialise pas la toxicité des UV_A.

In untreated epidermis:

A very slight cytotoxicity was observed in epidermis exposed to UV_A at 6 J/cm² (97% viability). This UV_A dose could be considered as non cytotoxic.

In treated epidermis:

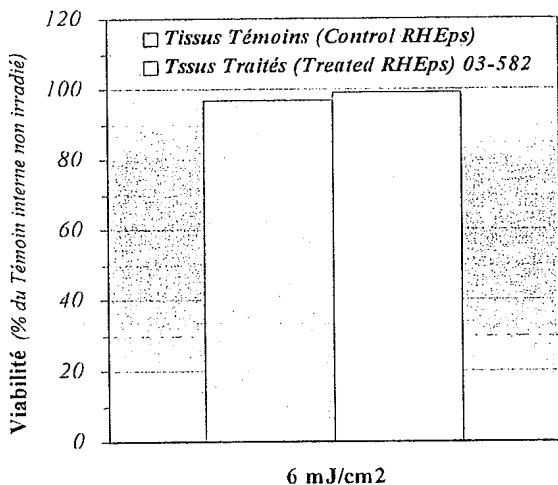
In the absence of UV_A irradiation, the tested product induced a very slight decrease in MTT response of tissues. Comparatively to the untreated tissues, MTT response was decreased by 6%, indicating a very low toxicity of the product [03.582] on human epidermis.

A similar response to UV_A radiation was observed in treated epidermis. Viability of treated epidermis was reduced by 2% after exposure to 6 J/cm² dose (3% in control epidermis).

These results indicate that the test compound 03.581 does not induce any significant increase of UV_A-induced toxicity.

La figure suivante illustre les résultats obtenus (viabilité exprimée en % du contrôle « Epidermes Non Irradiés).

Data (viability expressed in % of "non-irradiated Epidermis" control) are illustrated by the following figure.



4. ARCHIVAGE - ARCHIVES

Le protocole, la correspondance, le rapport final sont conservés au sein de la Société BIO-HC, dans un local prévu à cet effet, pendant 10 ans. Les échantillons des produits, les données brutes et les avenants au protocole sont archivés et conservés au sein de la Société BIO-HC, dans un local prévu à cet effet, pendant 1 an. À l'issue de cette période, les échantillons seront détruits et les données brutes seront restituées au commanditaire de l'étude.

Toutes les données relatives à cette étude sont archivées sous la référence PTCE 03.581/582.

The protocol, the correspondence and the final report are stored in special premises of the Company BIO-HC for 10 years.

The samples of the test products , the raw data and the amendments to the protocol are archived and stored in premises of BIO-HC for 1 year. This time elapsed, the sample of product will be destroyed and the raw data will be returned to the Sponsor.

All the documents related to this study are stored under the reference PTCE 03.581/582.

5. RESUME & CONCLUSION - SUMMARY & CONCLUSION

Le but de cette étude a été d'apprécier, *in vitro*, le potentiel phototoxique des produits « VITAMINE K1 PHYTONADIONE » et « VITAMINE K OXYDE » sur un modèle d'épidermes humains reconstruits.

Le principe de l'étude reposait sur la comparaison de la cytotoxicité des UV_A en absence et en présence des produits étudiés. Les produits à l'étude ont été appliqués, tel quel, à la surface d'épidermes reconstruits SkinEthic. L'irradiation UV_A (6 J/cm²) a été réalisée 24h après l'application topique du produit. La viabilité des épidermes a été appréciée par un test MTT, 24 h après l'irradiation.

Dans les conditions expérimentales retenues, les résultats de cette étude ont montré que :

- la viabilité des épidermes traités avec « VITAMINE K1 PHYTONADIONE » est très nettement diminuée après exposition UV_A, ce qui permet de considérer cette substance comme **phototoxique in vitro**.
- la viabilité des épidermes traités avec « VITAMINE K OXYDE » n'est pas diminuée de manière significative après exposition UV_A, ce qui permet de considérer ce composé comme **non phototoxique in vitro**.

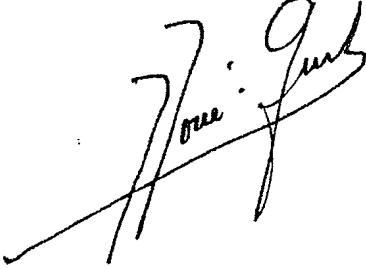
The aim of this study was to evaluate the phototoxic potential of the test compounds "VITAMINE K1 PHYTONADIONE" and "VITAMINE K OXYDE" using a human reconstructed skin model.

The basis of this study was a comparison of the cytotoxicity of UV_A exposure after application of test products on the surface of biopsies. The present study used a new reconstituted human epidermis model SkinEthic. The test compounds were applied, as supplied, topically on the surface of human reconstructed epidermis, 24 hr before UV_A light. Biopsies were then exposed to 6 J/cm² UV_A dose. Cell viability was quantified by a MTT test, 24 hr after the irradiation.

Under the experimental conditions described in the following report, it has been shown that:

- the viability of tissues treated with "VITAMINE K1 PHYTONADIONE" in UV_A irradiation conditions is markedly decreased as compared to that in UV_A-protected conditions. So, "VITAMINE K1 PHYTONADIONE" can be considered as **phototoxic in vitro**.
- the viability of treated tissues with "VITAMINE K OXYDE" in UV_A irradiation conditions is comparable to that in UV_A-protected conditions. So, "VITAMINE K OXYDE" can be considered as **not phototoxic in vitro**.

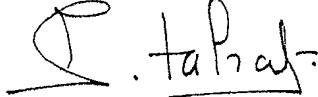
Marc BOUE-GRABOT
Docteur en Pharmacie
Doctor in Pharmacy Sciences



Date : 04.08.2004

Approuvé par :
(Approved by)

Brigitte HALAVIAT
Assurance Qualité
Quality Assurance



Date : 05.08.04